

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung.....	1
2	Problemstellung und Zielsetzung.....	4
3	Theoretische Grundlagen	6
3.1	Klassifizierung von Antibiotika	6
3.1.1	Definition, Wirkungstypen und Klassifizierungsmöglichkeiten	6
3.1.2	Aufbau von Bakterienzellen	8
3.1.3	Wirkmechanismen, Struktur-Wirkungsbeziehungen und Wirkungsspektren	10
3.1.3.1	Einteilung der Antibiotika nach Wirkmechanismen	10
3.1.3.2	Wirkungsspektrum von Antibiotika	11
3.1.3.3	Wirkmechanismus der Tetracycline.....	12
3.2	Struktureller Aufbau und Struktur-Wirkungsbeziehungen der Tetracycline.....	12
3.2.1	Struktur und Nomenklatur.....	12
3.2.2	Struktur-Wirkungs-Beziehungen von Tetracyclinen.....	14
3.3	Pharmakologie der Tetracycline	14
3.4	Resistenzmechanismen, Gefährdung des Verbrauchers und Rechtliche Bewertung	16
3.4.1	Resistenzmechanismen.....	16
3.4.1.1	Definition und Möglichkeiten der Resistenzentstehung.....	16
3.4.1.2	Resistenzeigenschaften gegenüber Tetracyclinen	17
3.4.2	Gefährdung des Verbrauchers durch den Einsatz von Antibiotika	18
3.4.3	Rechtliche Bewertung von pharmakologisch wirksamen Stoffen in Lebensmitteln tierischen Ursprungs.....	20
3.5	Eigenschaften der Tetracycline	22
3.5.1	Physikalische und chemische Eigenschaften.....	22
3.5.2	Komplexbildung.....	23
3.5.3	Umwandlungs- und Abbaureaktionen.....	24
3.5.3.1	Epimerisierung	24
3.5.3.2	Isomerisierung	25
3.5.3.3	Keto-Enol-Tautomerie.....	26
3.5.3.4	Dehydratation.....	27
4	Stand der Tetracyclin-Analytik	29
5	Ergebnisse und Diskussion	33
5.1	Untersuchungsmethodik und Projektverlauf.....	33
5.1.1	Haus Düsse-Studie.....	34

5.1.2	FAL-Studie	35
5.2	Methodenentwicklung zur Bestimmung von CTC und Metabolite in biologischen Proben	37
5.2.1	Entwicklung des HPLC-UV-MS/MS-Verfahrens	37
5.2.1.1	Auswahl der mobilen und stationären Phase	37
5.2.1.2	Entwicklung der MS/MS-Detektion	39
5.2.1.3	Stabilität von CTC und e-CTC in Lösung	41
5.2.2	Entwicklung und Optimierung der Probenvorbereitung	44
5.2.2.1	Auswahl des SPE-Materials	46
5.2.2.2	Einfluß der Zusammensetzung des Extraktionsmittels	46
5.2.2.3	Wiederfindungsstudien mit CTC und e-CTC	47
5.2.2.4	Einfluß einzelner Probenvorbereitungsschritte auf die Epimerisierung	48
5.2.2.5	Urin, Plasma und Faeces	49
5.2.2.6	Muskulatur, Leber und Niere	52
5.2.2.7	Optimierung der Probenvorbereitung für Muskulatur	54
5.2.2.8	Knochen	56
5.2.3	Zusammenfassung der Ergebnisse der Verfahrensentwicklung	58
5.3	Validierung des Analysenverfahrens zur Bestimmung von CTC und e-CTC	60
5.3.1	Kalibrierung	61
5.3.1.1	Wahl des Arbeitsbereiches	61
5.3.1.2	Linearität	62
5.3.2	Nachweis- und Bestimmungsgrenze	64
5.3.3	Selektivität des Verfahrens zur Bestimmung von CTC und e-CTC in Muskulatur	65
5.3.3.1	Selektivitätstest durch Peaklöschung nach alkalischer Behandlung	66
5.3.3.2	Selektivitätstest durch Vergleich der Retentionszeiten	66
5.3.3.3	Selektivitätstest durch Vergleich der UV- und MS-Spektren	67
5.3.4	Systematische und zufällige Fehler	69
5.3.4.1	Richtigkeit	69
5.3.4.2	Matrixbedingte Signalbeeinflussung bei der ESI-MS/MS-Detektion	72
5.3.4.3	Präzision	74
5.3.5	Zusammenfassung der Validierungsergebnisse für die Bestimmung von CTC und e-CTC in Muskulatur	76
5.3.6	Validierung des HPLC-UV-MS/MS-Verfahrens für die Bestimmung von CTC und e-CTC in Urin, Faeces, Plasma, Knochen, Leber und Niere	77
5.4	Anwendung des Analysenverfahrens auf Proben der Medikationsstudien	79
5.4.1	Haus Düsse-Studie	79
5.4.1.1	Ausscheidungsverhalten von CTC in Urin	79

5.4.1.2	CTC-Gehalte in Schlachtproben.....	81
5.4.1.3	Resistenzuntersuchungen.....	82
5.4.1.4	Zusammenfassung.....	83
5.4.2	FAL-Studie.....	83
5.4.2.1	CTC und e-CTC in Urin, Faeces und Plasma.....	84
5.4.2.2	Bilanzierung (Applikation-Exkretion).....	87
5.4.2.3	Schlachtproben.....	88
5.4.2.4	Zusammenfassung.....	89
5.4.3	Ergebnisse der Studien und Konsequenzen.....	89
5.5	Identifizierung von Tautomeren.....	90
5.6	<i>In vitro</i>- und <i>in vivo</i>-Bildung von Metaboliten des CTC.....	93
5.6.1	<i>In vitro</i> -Bildung.....	93
5.6.2	<i>In vivo</i> -Bildung.....	94
5.7	Antibiotische Aktivitäten.....	96
5.7.1	Agar-Diffusionstest.....	96
5.7.2	Bildung von Abbauprodukten während des Agar-Diffusionstests.....	98
5.7.3	Zusammenfassung der Ergebnisse und Konsequenzen.....	100
5.8	Methodenentwicklung zur quantitativen Bestimmung weiterer CTC-Metabolite.....	100
5.8.1	HPLC-UV-MS/MS-Verfahren.....	101
5.8.1.1	Stabilität der Metabolite in Lösung.....	101
5.8.1.2	Kalibrierung.....	102
5.8.2	Probenvorbereitung.....	103
5.8.2.1	Wiederfindung von iso-CTC, Anhydro-CTC und e-Anhydro-CTC.....	103
5.8.2.2	Einfluß einzelner Probenvorbereitungsschritte auf die Epimerisierung.....	104
5.8.2.3	iso-CTC und e-iso-CTC als Summenparameter.....	105
5.8.3	Zusammenfassung.....	106
5.9	Anwendung des erweiterten Analysenverfahrens auf Proben der FAL-Studie.....	107
5.9.1	Schlachtproben.....	107
5.9.2	Gebundene CTC-Rückstände in Knochen.....	109
5.9.2.1	Freisetzung von CTC aus Knochen.....	111
5.9.2.2	Fluoreszenz-Screening-Test.....	114
5.9.2.3	Applikation von CTC und Ablagerungsmuster in Knochen.....	114
5.9.3	Bilanzierungsstudie von Tier 95.....	116
5.9.3.1	Urin und Faeces.....	116
5.9.3.2	Schlachtproben.....	118
5.9.3.3	Bilanzierung.....	119

5.9.4	Konsequenzen.....	122
6	Zusammenfassung und Ausblick	123
7	Experimenteller Teil.....	128
7.1	Chemikalien.....	128
7.2	Geräte.....	128
7.2.1	HPLC-UV-MS/MS Triple Quadrupol-System	128
7.2.2	Probenzerkleinerung	129
7.2.3	Probenhomogenisierung	129
7.2.4	Zentrifugen	129
7.2.5	SPE-Extraktionseinheit.....	129
7.2.6	TurboVap.....	129
7.2.7	pH-Meter.....	130
7.2.8	UV-Lampe	130
7.3	Lösungen/Reagenzien	130
7.3.1	Mobile Phase	130
7.3.2	McIlvain-Puffer, pH 4 mit 0,1 mol/L EDTA.....	130
7.3.3	Stammlösungen.....	130
7.3.4	Standardlösungen.....	130
7.3.5	Kalibrierlösungen	131
7.4	Medikationsstudien.....	131
7.4.1	Haus Düsse-Studie.....	131
7.4.2	FAL-Studie	133
7.5	Methodenentwicklung	135
7.5.1	Chromatographische Bestimmung.....	135
7.5.2	Stabilität von CTC und e-CTC in Lösung.....	137
7.5.3	Entwicklung und Optimierung der Probenvorbereitung.....	137
7.5.3.1	Auswahl der SPE-Materials.....	137
7.5.3.2	Einfluß der Zusammensetzung des Extraktionsmittels.....	137
7.5.3.3	Wiederfindungsstudien mit CTC und e-CTC	138
7.5.3.4	Einfluß einzelner Probenvorbereitungsschritte auf die Epimerisierung von CTC und e-CTC.....	138
7.5.3.5	Zusammenfassung des SPE-Verfahrens	138
7.5.4	Probenvorbereitung verschiedener Matrices.....	138
7.5.4.1	Urin, Plasma und Kot	138
7.5.4.2	Muskulatur, Leber und Niere.....	139
7.5.4.3	Optimierung des Extraktionsverfahrens für Muskulatur	140

7.5.4.4	Knochen	140
7.6	Validierung des Analysenverfahrens	141
7.6.1	Linearer Bereich	141
7.6.2	Kalibriergeraden	141
7.6.3	Nachweis- und Bestimmungsgrenze	142
7.6.4	Selektivität	142
7.6.4.1	Selektivitätstest durch Peaklöschung nach alkalischer Behandlung	142
7.6.4.2	Selektivitätstest durch Vergleich der Retentionszeiten	142
7.6.4.3	Selektivitätstest durch Vergleich der UV- und MS-Spektren	142
7.6.5	Richtigkeit	142
7.6.6	Matrixbedingte Signalbeeinflussung bei der massenspektrometrischen Detektion	143
7.6.6.1	Matrixkalibrierung	143
7.6.6.2	Kontinuierliche Nachsäulen-Injektion von CTC	143
7.6.7	Präzision	143
7.6.7.1	Meßpräzision	143
7.6.7.2	Methodenpräzision	143
7.6.8	Validierungsparameter für Urin, Kot, Plasma, Knochen, Leber und Niere	144
7.7	Identifizierung tautomerer Verbindungen von CTC	144
7.8	<i>In vitro</i>-Bildung von Metaboliten des CTC	144
7.9	Antibiotische Aktivitäten	145
7.9.1	Agar-Diffusionstest	145
7.9.2	Abbaureaktionen während des Agar-Diffusionstestes	145
7.10	Methodenentwicklung zur quantitativen Bestimmung weiterer CTC-Metabolite	146
7.10.1	Herstellung einer Standardlösung aus iso-CTC und e-iso-CTC	146
7.10.2	Linearer Bereich	146
7.10.3	iso-CTC und e-iso-CTC als Summenparameter	147
7.10.4	Wiederfindung von iso-CTC, Anhydro-CTC und e-Anhydro-CTC	147
7.10.5	Einfluß einzelner Probenvorbereitungsschritte auf die Epimerisierung von iso-CTC, Anhydro-CTC und e-Anhydro-CTC	147
7.11	Gebundene CTC-Rückstände in Knochen	147
7.11.1.1	Freisetzung von CTC aus Knochen	147
7.11.1.2	Fluoreszenz-Screening-Test	148
8	Literatur	149
A	Anhang	A 1